

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17380170

研究課題名（和文） 原始卵胞卵からの産仔発生システムの開発

研究課題名（英文） Development of blastocysts from porcine primordial follicles following xenografting to nude mice

研究代表者

金子 浩之（Kaneko Hiroyuki）

独立行政法人 農業生物資源研究所 生殖機構研究ユニット 上級研究員

研究者番号：60343993

研究成果の概要：卵巣に存在する原始卵胞卵は雌側の遺伝情報を伝える重要な資源であるが、未だ活用されていない。この研究では、ブタをモデルとして異種間移植、体外培養および顕微操作を組み合わせて、原始卵胞卵を人為的に発育させ、さらに初期胚へと発生させることに成功した。これら一連の成果は、希少な動物あるいは家畜の原始卵胞卵から個体を再生する上で、必要不可欠な手法である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,400,000	0	3,400,000
2006年度	5,200,000	0	5,200,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	13,800,000	1,560,000	15,360,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：発生工学、原始卵胞卵、異種間移植、体外培養系、胚発生

1. 研究開始当初の背景

原始卵胞は生殖活動期のみならずあらゆる年齢の卵巣において最も多く存在しており、そこに含まれる卵（原始卵胞卵）は雌側の遺伝情報を伝える器として重要な遺伝資源である。しかしながら、原始卵胞卵は極めて未発育であるため発生能を獲得していない。1989年にGosdenらがヒツジの卵巣を免疫不全マウスに移植することによって、未発育な卵胞を胞状卵胞（発育卵胞）へと人為的に発育させ得ることを示した。それ以降、異種間移植が未発育な卵を人為的に発育させる有力な手法と期待され、ヒト、家畜および野生

動物の卵巣が免疫不全動物に移植された。しかしながら、幼若マウスの卵巣を遺伝的な距離が近いヌードラットへ移植した例において、移植卵巣由来の産仔が得られたのみである(Snow et al. 2002)。他の哺乳動物の移植例では、移植卵巣が発育し内分泌的機能をもつことは数多く報告されてきたが、卵の発育・発生能に関しては知見がほとんどなかった。

そのような状況の中で、私たちは卵胞のほとんどが原始卵胞で占められる新生仔ブタ卵巣を選択し、卵巣を摘出したヌードマウスに移植し、卵胞発育処置（ホルモン投与）の

最適な時期を検討した。その結果、膣開口（即ち移植卵巢内の胞状卵胞の出現時）から60日後に妊馬絨毛性腺刺激ホルモン（eCG）を48時間マウスに投与することによって、ブタ原始卵胞卵を多数発育させ、体外培養系で受精能を付与することに初めて成功した（Kaneko et al. 2003）。しかしながら、それらの受精卵は8細胞期まで発生が進行しえるが、胚盤胞には到達せず、さらなる改善が求められた。

2. 研究の目的

大型哺乳動物の原始卵胞卵の活用には、原始卵胞卵を産仔、少なくとも初期胚にまで発生させる系の開発が必須である。マウス体内で発育させ回収したブタの卵は受精には成功しても胚盤胞には至らなかったことから（Kaneko et al. 2003）、細胞質の成熟が完全でないと考えられた。本研究においては2つのアプローチによって、ヌードマウス体内で発育させたブタ卵の細胞質成熟度を高めて胚発生能を付与することを試みた。

(1) ヌードマウスへのホルモン処理法の改良による卵の発育促進： 卵は卵胞の支持のもとで発育し発生能を獲得する。ブタ体内で正常に発育した直径3mm以上の胞状卵胞から採取した卵は体外培養系で胚発生能を有している（Kikuchi et al. 2002）。一方、48時間のeCG投与後の移植ブタ卵巢内の胞状卵胞の径はほとんどが2mm以下であった。そこで、移植卵巢内の卵胞をさらに発育させ卵の細胞質成熟を全うさせるために、1から2週間のブタ卵胞刺激ホルモン（FSH）の持続投与を行った後、卵の発生能を解析した。

(2) 回収卵へのブタ体内発育卵の細胞質融合： ブタ体内で発育した卵は体外培養系で胚盤胞に到達することから、細胞質成熟度が高いと判断される。そこで、ヌードマウスから回収した卵の細胞質成熟度を直接高めることを目的として、回収卵にブタ体内で発育した卵の細胞質を融合し、発生能を解析した。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウスへのホルモン処理法の改良による卵の発育促進： 卵胞のほとんどが原始卵胞で占められる20日齢の新生仔ブタの卵巢を1mm角前後に細切し、卵巢を摘出したヌードマウスの腎皮膜下に20個ずつ移植した。マウスの膣開口をもって移植卵巢組織内における胞状卵胞の出現とした。今回の一連の実験においては、移植後50から80日後に胞状卵胞の出現が確認された。胞状卵胞の出現後60日のマウスに、eCGの皮下投与、またはブタFSHを充填した浸透圧ポンプの皮下留置を行った。移植卵巢および末梢血をeCG投与

2日（eCG-2群）または3日後（eCG-3群）、FSH投与7日間（FSH-7群）または14日間後（FSH-14群）に採取した。また、血腫卵胞の出現を抑制する目的で、FSH処理開始7日後に抗エストロジオール血清を投与し、14日後にサンプルを採取した（FSH-14EA群）。

卵胞の発育状況を組織学的に解析するとともに、卵胞の顆粒層細胞で生産されるインヒビンの血中濃度を蛍光免疫測定法で測定することによって機能的に評価した。移植卵巢から卵を回収し、体外培養系を用いて第二減数分裂中期（MII期）への移行率（成熟率）、ついで受精率（前核形成の確認）を解析した。さらに体外受精卵を体外発生系に移し7日間の培養後、初期胚への発生率および胚の質（細胞数）を解析した。

(2) 回収卵へのブタ体内発育卵の細胞質融合： 以下の2つの方法を検討した。

①再構成卵の作製： マウスより回収したブタ原始卵胞由来の発育卵を体外培養系でMII期にまで成熟させた。ついでこれらの成熟卵をFahrudinら（2007）の方法に基づきパーコールの濃度勾配溶液内で遠心し小片化し、核板を含む細胞質小片を集めた。一方、通常のブタ卵を屠場卵巢より採取しMII期にまで成熟させた後、同様に小片化した。移植卵巢内で発育した卵から調整した核板を含む細胞質小片1個と、通常卵より調整した核板を含まない細胞質小片3個を電気融合させ、再構成卵を作出した（図1）。この再構成卵に体外受精を行った後、体外発生系で初期胚への発生率および胚の質（細胞数）を解析した。

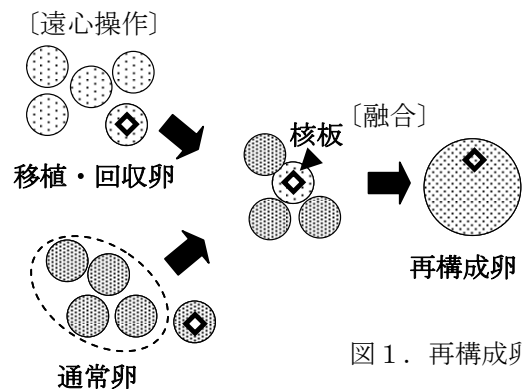


図1. 再構成卵

②融合卵の作製： マウスからブタ原始卵胞由来の発育卵を採取し、体外培養系でMII期にまで成熟させた。別途、通常のブタ卵を屠場卵巢より採取し成熟させた後、Fahrudinら（2007）の方法に基づきパーコールの濃度勾配溶液内で遠心し小片化した。核板を含まない細胞質小片を3個選び、MII期のマウスから回収・成熟したブタ卵に電気融合させた（融合卵：図2）。融合卵を体外受精

した後、体外発生系において初期胚への発生率および胚の質を解析した。

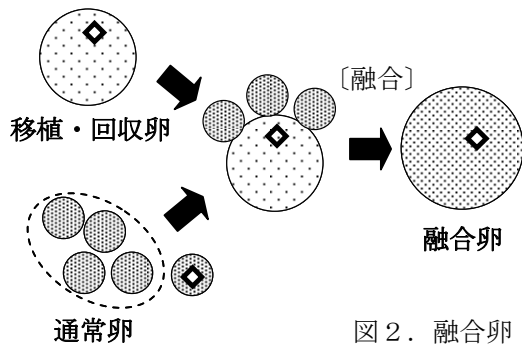


図2. 融合卵

4. 研究成果

(1) ヌードマウスへのホルモン処理法の改良による卵の発育促進：ヌードマウスに対する性腺刺激ホルモン（eCGおよびFSH）処理は、無処理群に比較して、移植ブタ卵巢内の卵胞発育を促進した。特に、マウスにFSHを14日間投与するとともに、血腫の発生抑制のため抗エストラジオール血清を投与した群（FSH-14EA群）において、卵胞の発育が最も顕著であった（図3）。FSH-14EA群の卵胞径は、屠場から採取したブタ体内で発育した卵胞のサイズに匹敵するものであった（図3）。マウスの血中インヒピン濃度は各群の胞状卵胞の発育状況に対応して上昇を示した（図4）。

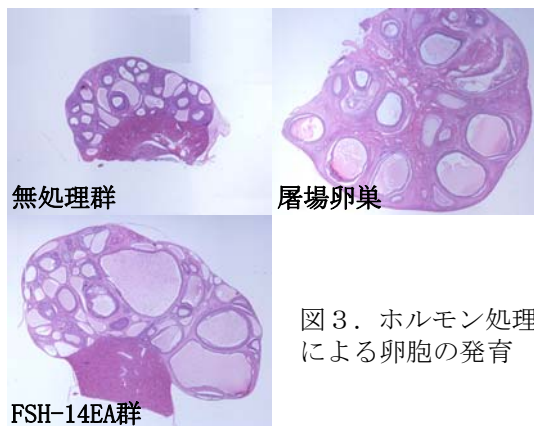


図3. ホルモン処理による卵胞の発育

直径 $115\mu\text{m}$ 以上のフルサイズに達したと判断できるブタ卵の採取数は、マウス1匹あたり、eCG-3では 68 ± 11 （平均値 \pm 標準誤差）、個、FSH-7群では 60 ± 11 個およびFSH-14EA群では 49 ± 9 個であり、ホルモン無処理群（ 18 ± 5 ）に比較して明らかな増加を示した。体外培養後、無処理群（ 4 ± 1 個）に比較して、上記3処理群ではより多数の卵が成熟した（eCG-3群； 13 ± 3 個、FSH-7群； 21 ± 4 個およびFSH-14EA群； 16 ± 5 個）。さらに各実験群100個前後の成熟卵を体外受精し7日間の体外培養した結果、eCG-3群、FSH-7群およびFSH-14EA群においてそれぞれ1受精卵ずつ

胚盤胞へと発生した（図5）。胚盤胞の構成細胞数はそれぞれ10個、20個および30個であった。

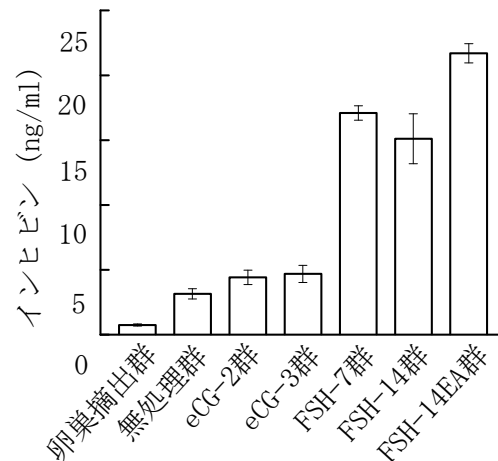


図4. ホルモン処理後のブタ卵巢移植マウスの血中インヒピン濃度。卵巢摘出群：ブタ卵巢を移植しない卵巢摘出マウス。

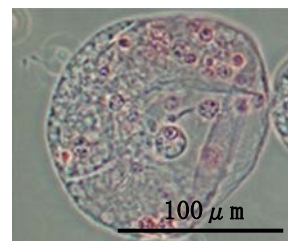


図5. FSH-14EA群で得られた胚盤胞（細胞数30）

これらの結果は、マウスに適切なホルモン処理を施すことによって、移植したブタ原始卵胞を効果的に発育させ成熟能を付与できること、さらには胚発生能をも付与できることを初めて示したものである（Kaneko et al. 2006）。しかしながら、本実験の胚発生率（1%）は、通常の卵を用いた体外生産胚の発生率（20から30%）に比較して依然として低率であった。そこで次に、FSHと抗エストラジオール血清を併用投与（FSH-14EA処理）したマウスから採取したブタ卵に、成熟度の高いブタ体内発育卵の細胞質を融合し、胚発生能を高めることを試みた。

(2) 回収卵へのブタ体内発育卵の細胞質融合：以下の2つの実験には、FSHを14日間投与するとともに、血腫の発生抑制のため抗エストラジオール血清を投与したヌードマウスから採取した発育ブタ卵を用いた。

①再構成卵の発生能：マウスから回収したブタ発育卵の核板を含む細胞質小片1個と、通常の卵から調整した核板を含まない細胞質小片3個を電気融合させ、56個の再構成卵を作出した。56個の再構成卵を体外受精し7日間培養した結果、4個が胚盤胞へと発生

した（胚発生率：7%）。胚盤胞の平均細胞数は 13.6 ± 1.8 （平均値±標準誤差）個であった（図6）。



図6. 再構成卵からの胚盤胞発生（細胞数20）

無操作のブタ原始卵胞由来の成熟卵が体外受精・発生系では1%しか胚盤胞に到達しなかった前述の結果に比べて、再構成卵の作製によって、ブタ原始卵胞卵からの胚発生率が改善されることが明らかとなった。

②融合卵の発生能：ヌードマウスから回収したブタ発育卵を体外成熟させた後に、通常の卵から調整した核板を含まない細胞質小片3個を電気融合させ、142個の融合卵を作出した。体外受精後、培養後7日目に胚への発生状況を観察した結果、このうち21個が胚盤胞へと発生した（胚発生率：14.8%）（図7）。胚盤胞の細胞数は10から128であった（平均細胞数； 29.7 ± 6.0 個）。

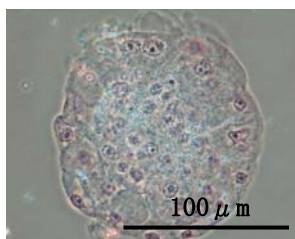


図7. 再構成卵からの胚盤胞発生（細胞数80）

前述の再構成卵の胚発生率に比べて、融合卵の作製によって、ヌードマウス体内で発育させたブタ原始卵胞卵の胚発生率がより改善された。さらに胚の質（構成細胞数）も格段に向上した。今後は融合卵の最適な作製条件を検討し、細胞数の多い胚盤胞の出現率を高める必要がある。

以上の一連の研究によって、大型哺乳動物の原始卵胞卵をヌードマウス移植し適切なホルモン処理を加えることによって人為的に発育させ、体外培養系で成熟能および受精能を効果的に付与することに成功した。さらに、移植した原始卵胞卵に由来する発育卵の胚発生能を、融合卵の作製によって著しく向上させることにも成功した。これらの成果は、原始卵胞卵を活用する上で必須のステップである。今後、受精した融合卵を成雌ブタへ移植することによって産仔生産が可能となれば、原始卵胞卵をターゲットする生殖細胞の保存・個体再生という新規システムの実現

が期待できる。

参考文献（引用順）

- Gosden et al. J Reprod Fertil 101: 619-623 (1994).
Snow et al. Science 297: 2227 (2002).
Kaneko et al. Biol Reprod 69: 1488-1493 (2003).
Kikuchi et al. Biol Reprod 66: 1033-1041 (2002).
Fahrudin et al. Cloning Stem Cells 9: 216-218 (2007).

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計7件）

- ① Maedomari N, Kikuchi K, Nagai T, Fahrudin M, Kaneko H, Noguchi J, Nakai M, Ozawa M, Somfai T, Nguyen LV, Ito J, Kashiwazaki N. Nuclear replacement of in vitro-matured porcine oocytes by a serial centrifugation and fusion method. Reprod Domest Anim (2009), *in press*. 査読有り。
- ② Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Generation of porcine diploid blastocysts after injection of spermatozoa grown in nude mice. Theriogenology (2009), *in press*. 査読有り。
- ③ Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Noguchi J. Endocrine status and development of porcine testicular tissues in host mice. J Reprod Dev 54: 480-485 (2008). 査読有り。
- ④ Kikuchi K, Kashiwazaki N, Nagai T, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Kaneko H. Selected aspects of advanced porcine reproductive technology. Reprod Domest Anim 43(Suppl 2): 401-406 (2008). 査読有り。
- ⑤ Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Maedomari N, Kashiwazaki N. Xenografting of porcine immature germ cells and their developmental competence. J Reprod Engineering 10(Suppl): 436-448 (2007). 査読有り。
- ⑥ Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, Kashiwazaki N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. Reproduction 131: 279-288 (2006). 査読有り。

有り。

- ⑦ Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Kashiwazaki N. In vitro and in vivo developmental ability of oocytes derived from porcine primordial follicles xenografted into nude mice. J Reprod Dev 52: 51-57 (2006). 査読有り。
- [学会発表] (計9件)
- ① 金子浩之、菊地和弘、中井美智子、野口純子。幼若ブタ精巢を移植したヌードマウスの内分泌的特徴と移植精巢の発育。第100回日本繁殖生物学会大会、2007年10月、東京大学。
- ② 前泊直樹、菊地和弘、中井美智子、小沢学、ソムファイタマス、伊藤潤哉、野口純子、金子浩之、永井卓、柏崎直巳。遠心・融合核置換ブタ卵の細胞質量増加による体外受精および胚発生の改善。第100回日本繁殖生物学会大会、2007年10月、東京大学。
- ③ Maedomari N, Kikuchi K, Fahrudin M, Nakai M, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kashiwazaki N. Parthenogenetic development of porcine oocytes reconstructed by centrifugation and electrofusion after metaphase-II chromosome transfer. 国際胚移植学会 (IETS) 2007年1月、京都。
- ④ 金子浩之、菊地和弘、中井美智子、前泊直樹。異種間移植を利用した未成熟生殖細胞の成熟と胚発生。第9回SSREシンポジウム、2007年3月、明治大学。
- ⑤ 前泊直樹、柏崎直巳、中井美智子、Fahrudin, M、野口純子、金子浩之、菊地和弘。遠心・融合による核置換により作出したブタ再構築卵の発生能。第99回日本繁殖生物学会大会、2006年9月、名古屋大学。
- ⑥ 中井美智子、菊地和弘、柏崎直巳、ソムファイタマス、小沢学、前泊直樹、野口純子、金子浩之。ヌードマウスへ移植したブタ精巢組織から得られた精子を用いての胚生産。第99回日本繁殖生物学会大会、2006年9月、名古屋大学。
- ⑦ Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N, Ozawa M, Noguchi J, Ohnuma K, Kaneko H. Porcine blastocysts derived from in vitro matured oocytes injected intra-cytoplasmically with a sperm from testicular tissue xenografted into nude mice. 国際胚移植学会 (IETS)、2006年1月、オランダ。
- ⑧ Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Nakai M, Kashiwazaki N, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomori N. Effects of hormone treatments on the developmental competence of porcine primordial

follicles following xenografting to nude mice. 第38回米国繁殖学会 (SSR)、2005年7月、ケベック。

- ⑨ 金子浩之、菊地和弘、野口純子、小沢学、大沼克彦、前泊直樹。異種間移植によるブタ原始卵胞卵子からの初期胚発生の試み。第98回日本繁殖生物学会大会、2005年9月、静岡大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 浩之 (Kaneko Hiroyuki)
独立行政法人・農業生物資源研究所・動物科学研究領域・生殖機構研究ユニット・上級研究員

研究者番号：60343993

(2) 研究分担者

菊地 和弘 (Kikuchi Kazuhiro)
独立行政法人・農業生物資源研究所・動物科学研究領域・生殖機構研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20360456

(3) 連携研究者

柏崎 直巳 (Kashiwazaki Naomi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232